

## NEW CELL ADHESION INHIBITING PEPTIDE DERIVATIVE

Patent Number: JP8208692  
Publication date: 1996-08-13  
Inventor(s): MATSUDA MICHIO; ASAKURA SHINJI; MIYUURAA ESUTERU UERUNAA  
Applicant(s): SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD  
Requested Patent: ☐ JP8208692  
Application Number: JP19950276418 19950928  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C07K7/08 ; A61K38/00 ; A61K38/00 ; A61K38/00 ; A61K38/17 ; A61K38/17 ; C07K7/06  
EC Classification:  
Equivalents:

### Abstract

**PURPOSE:** To obtain a new cell adhesion inhibiting peptide derivative useful as a cancer metastasis inhibitor, an inhibitor of blood platelet aggregation, a wound curing agent, a vulnerary agent, a therapeutic agent for inflammatory diseases, having inhibitory action on cell adhesion, containing a partial amino acid sequence in a human polymer kininogen L chain having specific amino acid sequence.  
**CONSTITUTION:** This new peptide derivative (salt) comprises a partial amino acid sequence in a human polymer kininogen L chain having an amino acid sequence shown by any of formula I to formula III. The derivative (salt) has inhibitory action on cell adhesion and is useful as a cancer metastasis inhibitor, an inhibitor of blood platelet aggregation, a wound curing agent, a vulnerary agent, a therapeutic agent for inflammatory diseases, an inhibitor for arteriosclerosis and a therapeutic agent for glomerular nephritics. The peptide derivative is obtained by synthesizing plural kinds of peptides by a peptide solid phase synthesis method so as to specify an adherent core existing in a histidine-rich domain (372-523 position) having high inhibitory activity against cell adhesion in L chain from N-end to 372-626 position end of an amino acid sequence of a human polymer kininogen and specifying a sequence having high inhibitory activity against cell adhesion by examination of cell adhesion activity test for fibroblast cells.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-208692

(43) 公開日 平成8年(1996)8月13日

(51) IntCl.<sup>6</sup>

C 0 7 K 7/08

A 6 1 K 38/00

識別記号

Z N A

A B E

A B X

庁内整理番号

8517-4H

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 37/ 02

A B E

A B X

審査請求 未請求 請求項の数6 FD (全14頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-276418

(22) 出願日 平成7年(1995)9月28日

(31) 優先権主張番号 特願平6-259451

(32) 優先日 平6(1994)9月28日

(33) 優先権主張国 日本(JP)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年4月 社団法人日本血液学会発行の「第56回日本血液学会抄録集」に発表

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 松田 道生

栃木県宇都宮市緑5丁目12番1号

(72) 発明者 朝倉 伸司

栃木県河内郡南河内町薬師寺3265-9 グ

リーントウン109-1-B-304

(72) 発明者 ミューラー・エステル, ウェルナー

ドイツ国 D-55099 マインツ、ドイス

ベルグベーク 6

(54) 【発明の名称】 新規な細胞接着抑制ペプチド誘導体

(57) 【要約】

【課題】 新規な癌転移抑制剤、血小板凝集抑制剤、創傷治癒剤、炎症治療剤、動脈疾患治療剤および糸球体腎炎治療剤の提供。

【解決手段】 本発明は、高分子キニノゲンL鎖中の部分アミノ酸配列（例えば、GlyLysGluGlnGlyHisThrArgArgHisAspTrpGlyHisGluLysGlnArgLys等）を有する新規な細胞接着抑制ペプチドに関する。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1)、(2) または(3) のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するヒト高分子キニノゲン鎖中の部分アミノ酸配列からなるペプチド誘導体、またはその薬学的に許容される塩。

(1) GlyLysGluGlnGlyHisThrArgArgHisAspTrp

(2) HisAsnLeuGlyHisGlyHisLysHisGluArgAspGlnGlyHisGlyHisGlnArg

(3) HisLysHisGlyHisGlyHisGlyLysHisLysAsnLys

【請求項2】 (1)、(2) または(3) のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するヒト高分子キニノゲン鎖中の402位～498位のペプチド中の部分アミノ酸配列からなるペプチド誘導体、またはその薬学的に許容される塩。

(1) GlyLysGluGlnGlyHisThrArgArgHisAspTrp

(2) HisAsnLeuGlyHisGlyHisLysHisGluArgAspGlnGlyHisGlyHisGlnArg

(3) HisLysHisGlyHisGlyHisGlyLysHisLysAsnLys

【請求項3】 部分アミノ酸配列が、(1)、(2) または(3) で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のペプチド誘導体、またはその薬学的に許容される塩。

(1) GlyLysGluGlnGlyHisThrArgArgHisAspTrpGlyHisGluLysGlnArgLys

(2) HisLysHisGlyHisGlyHisGlyLysHisLysAsnLysGlyLysLysAsnGlyLysHis

(3) HisAsnLeuGlyHisGlyHisLysHisGluArgAspGlnGlyHisGlyHisGlnArgGly

【請求項4】 請求項1、2または3記載のペプチド誘導体またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする細胞接着抑制剤。

【請求項5】 請求項1、2または3記載のペプチド誘導体またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする癌転移抑制剤、血小板凝集抑制剤、創傷治癒剤、炎症治癒剤、動脈硬化抑制剤または糸球体腎炎治療剤。

【請求項6】 (1) または(2) で表されるアミノ酸配列を有するヒト高分子キニノゲン鎖中の部分アミノ酸配列からなるペプチド誘導体またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする細胞接着抑制剤。

(1) TrpGlyHisGluLysGlnArg

(2) LysGlyLysLysAsnGlyLysHis

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細胞接着抑制活性を有し、癌転移抑制剤、血小板凝集抑制剤、創傷治癒剤、炎症治癒剤、動脈硬化抑制剤または糸球体腎炎治療剤として有用な新規なペプチド誘導体に関する。

【0002】

【従来技術】 細胞と間質結合組織との接着に関与し、動物細胞の細胞機能に関連した多彩な生理活性を持つ蛋白

2

質は、細胞接着活性蛋白質と呼ばれており、このような蛋白質としては、例えばフィブロネクチン、ラミニン及びビトロネクチン等が知られている。フィブリノーゲンは、血小板膜糖タンパク複合体IIb/IIIa (β<sub>3</sub>インテグリン) と相互作用して、血小板の凝集を引き起こすことが知られている (実験医学, Vol. 10 No. 11 1382(1992))。これらの、細胞接着活性蛋白質は、構造的に類似したいくつかのファミリーを形成しており、これら細胞接着活性蛋白質を阻害する物質も最近明らかにされつつある。

【0003】 一般に、細胞接着活性蛋白質は、例えば前述のような種々の生物活性を有することから、それを制御する物質についての研究が近年盛んに行われており、例えば、ビトロネクチンやフィブロネクチンの接着コアであるトリペプチド Arg-Gly-Asp (以下、RGDという) には、癌の転移を抑制することが確認されている (Humphries, M. J. : Science, 233, 467(1986))。さらに、このような接着コアの繰返し構造からなるポリマーペプチドは、そのモノマーペプチドに比べ強い血小板凝集抑制活性および癌転移抑制活性を示すことが知られている (東ら, 特開平2-174798号公報)。しかしながら、上記の様なRGD誘導体では、ビトロネクチンとフィブロネクチンに共通する接着コアに対応するものであるため、この両者を選択、区別して細胞接着を抑制することができない。ところが、2本鎖高分子キニノゲンでは、細胞接着抑制に対する選択性が高く、フィブロネクチンを介しての細胞接着を抑制せず、ビトロネクチンやフィブリノーゲンを介しての細胞接着を抑制することが知られている (Asakura et al., J. Cell. Biol. 116:465-472, 1992)。

【0004】 2本鎖高分子キニノゲンは、血漿から得られる接触系凝固因子の一つであり、このように血液凝固に関するだけでなく、細胞接着にも密接に関係しているとの興味ある事実が示されている。すなわち、2本鎖高分子キニノゲンがその活性を阻害する細胞接着活性蛋白質のビトロネクチンは、被接着細胞のレセプターと結合し、その情報を接着細胞に伝達する役割を果たしており、細胞と間質結合組織との接着、細胞の伸展、移動や接触走性にも関与していることが知られている (藤本大三郎編, 「細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー」、125頁 (平成2年4月10日発行))。また、Asakura et al., J. Cell. Biol. 116:465-472 (1992)によれば、2本鎖高分子キニノゲンは、ビトロネクチンやフィブリノーゲンを介しての細胞接着阻害物質 (アンチインテグリン) であり、そのL鎖のヒスチジン-リッチ領域 (372位～523位) が細胞接着阻害活性に重要であるであろうことが示唆されている。

【0005】 「腎と透析」1994年臨時増刊号198-203頁には、以下の記載がある。メサンギウム細胞には種々のインテグリンが発現しており、糸球体腎炎において

は、そのインテグリンの発現が増加する。その発現が増加したインテグリンの役割としては、メサンギウム細胞が増殖してメサンギウム領域が拡大していく際の細胞外基質と結合する足場となる役割が推定されている。RGDペプチドは、フィブロネクチンに反応して遊走するメサンギウム細胞の遊走を阻害する。また、その誘導体である環状型RGDペプチドを馬腎炎ラットに投与したところ蛋白尿が抑制され、組織障害も軽減されたことから、RGDペプチドは糸球体腎炎の治療に応用できる可能性が示唆されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 上述のように、2本鎖高分子キニノゲンはヒトロネクチン等の細胞接着活性蛋白質を選択的に抑制することから、そのものがどのような接着コアを有するものであるのかの解明が求められていた。またそのような選択性のある接着コアのアミノ酸配列の様子が明らかになれば、そのアミノ酸配列を含むペプチド誘導体を用いて、より選択性の高い細胞接着抑制剤の開発が可能になると期待された。従って、本発明の目的は、より選択性の高い細胞接着抑制活性を有する新規なペプチド誘導体またはその薬学的に許容される塩を提供すること、およびこの新規なペプチド誘導体またはその薬学的に許容される塩を含有することを特徴とする癌転移抑制剤、血小板凝集抑制剤、創傷治癒剤、炎症治癒剤、動脈硬化抑制剤および糸球体腎炎治療剤を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決するために、2本鎖ヒト高分子キニノゲンの接着コアが存在すると考えられるL鎖のヒスチジン-リッチ領域(372位～523位)のアミノ酸配列断片を含む各種のペプチド誘導体を合成し、細胞接着抑制活性に関して、鋭意検討を行った。その結果、接着コアに該当する細胞接着抑制活性の高い箇所を見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】 すなわち、本発明は、

① (1)、(2) または(3) のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するヒト高分子キニノゲンL鎖中の部分アミノ酸配列からなるペプチド誘導体、またはその薬学的に許容される塩、

(1) GlyLysGluGlnGlyHisThrArgArgHisAspTrp

(2) HisAsnLeuGlyHisGlyHisLysHisGluArgAspGlnGlyHisGlyHisGlnArg

(3) HisLysHisGlyHisGlyHisGlyLysHisLysAsnLys

② (1)、(2) または(3) のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するヒト高分子キニノゲンL鎖の402位～498位のペプチド中の部分アミノ酸配列からなるペプチド誘導体、またはその薬学的に許容される塩、

(1) GlyLysGluGlnGlyHisThrArgArgHisAspTrp

(2) HisAsnLeuGlyHisGlyHisLysHisGluArgAspGlnGlyHisGlyHisGlnArg

(3) HisLysHisGlyHisGlyHisGlyLysHisLysAsnLys

③ 部分アミノ酸配列が、(1)、(2) または(3) で表されるアミノ酸配列である④記載のペプチド誘導体、またはその薬学的に許容される塩、

(1) GlyLysGluGlnGlyHisThrArgArgHisAspTrpGlyHisGluLysGlnArgLys

10 (2) HisLysHisGlyHisGlyHisGlyLysHisLysAsnLysGlyLysLysAsnGlyLysHis

(3) HisAsnLeuGlyHisGlyHisLysHisGluArgAspGlnGlyHisGlyHisGlnArgGly

④ ①、②または③記載のペプチド誘導体またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする細胞接着抑制剤、

⑤ ①、②または③記載のペプチド誘導体またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする癌転移抑制剤、血小板凝集抑制剤、創傷治癒剤、炎症治癒剤、動脈硬化抑制剤または糸球体腎炎治療剤、または

⑥ (1) または(2) で表されるアミノ酸配列を有するヒト高分子キニノゲンL鎖中の部分アミノ酸配列からなるペプチド誘導体またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする細胞接着抑制剤、

(1) TrpGlyHisGluLysGlnArg

(2) LysGlyLysLysAsnGlyLysHis

に関する。

【0009】 本発明において、ヒト高分子キニノゲン(HK)のL鎖とは、ヒト高分子キニノゲンのアミノ酸配列のN末端から372位～626位(C末)のものをいう(J. Biol. Chem., 260, 8601(1985))。文献によっては、このL鎖をヒト高分子キニノゲンのカルボキシ末端領域(フラグメント1・2とL鎖)とも言う(「日本臨床」47巻4号816-827(1989))。また、2本鎖ヒト高分子キニノゲン(HKa)とは、ヒト高分子キニノゲン(HK)がカリクレインにより切断されてブラジキニンを放出した後の2本鎖蛋白質をいう。2本鎖ヒト高分子キニノゲン(HKa)の接着コアに該当する細胞接着抑制活性の高い箇所は、つぎのようにして見出された。

【0010】 1) 2本鎖ヒト高分子キニノゲン(HKa)接着コア部位の特定

L鎖のヒスチジン-リッチ領域(372位～523位)に存在する接着コアを特定するため、表1の5種のペプチドを合成した。この合成ペプチドを用いて、線維芽細胞に対する細胞接着活性試験を行った。

【0011】

【表1】

	合成ペプチド	HK中のアミノ酸位置
P1	GKEQGHTRRHDWGHEKQRK	402-420
P2	HNLGHGCHKHERDQCHGHQRC	421-440
P3	GLGHGHEQQHGLGHGKH	442-458
P4	FKLDDDLHQGGHVLHDHGHK	459-478
P5	HKHGHGHHGKHKNKGKKNKGKH	479-498

【0012】3種のペプチド(P1、P2、P5)が、図1のように細胞接着活性を示したが、その他のペプチドは細胞接着活性を示さなかった。また、図2に示されるように、この3種のペプチド(P1、P2、P5)は細胞に付着することによって特異的に細胞接着を抑制していることが明らかとなった。また、図3で示されるように、この3種のペプチドの細胞接着活性は、HKaによって抑制されるが、フィブロネクチンを用いた場合には抑制されなかった。これらのことより、この3種のペプチドの対応するアミノ酸配列部分がHKaの細胞接着\*

\*抑制活性をもたらす接着コアであることが確認された。以上のことから、接着コアはP1、P2およびP5ペプチドに対応するアミノ酸配列部分に存在することが示された。さらに詳しくこの接着コアの部分特定するため、表2に記載されたP1、P2およびP5ペプチドおよびそのN末端を含む断片ペプチドを合成した。この合成ペプチドを用いて、線維芽細胞に対する細胞接着活性試験を行った。

【0013】

【表2】

	合成ペプチド	HK中のアミノ酸位置
P1a	GKEQGHTR	402-409
P1b	GKEQGHTRRHDW	402-413
P1c	GKEQGHTRRHDWGHEKQRK	402-420
P2a	HNLGHGCHKHERD	421-432
P2b	HNLGHGCHKHERDQCHGHQRC	421-440
P5a	HKHGHGHHGKHKNK	479-491
P5b	HKHGHGHHGKHKNKGK	479-498
P5c	HKHGHGHHGKHKNKGKKNKGKH	479-498

【0014】図4、図5および図6に示される細胞接着活性試験の結果から、P1、P2およびP5ペプチドのN末端を含む断片ペプチドの活性は、いずれもP1、P2およびP5ペプチドの活性より減少傾向を示したが、P1b、P5aおよびP5bでは、接着活性を十分保っている。しかし、さらに短いペプチドであるP1aおよびP2aでは、接着活性は完全に消失した。以上のことから、HKaの接着コアの部位は、P1b、P2またはP5aペプチドを中心とした部分と考えられる。従って、P1b、P2またはP5aペプチドのアミノ酸配列を少なくとも含むヒト高分子キニノゲンL鎖中の部分アミノ酸配列からなるペプチド誘導体が細胞接着抑制活性

を有することが明らかとなった。特に高い細胞接着抑制活性を有するペプチドとしては、P1b、P2またはP5aペプチドのアミノ酸配列を少なくとも含むL鎖のヒスチジン-リッチ領域(372位～523位)中の部分アミノ酸配列からなるペプチド誘導体が挙げられ、さらに高い細胞接着抑制活性を有するペプチドとしては、P1b、P2またはP5aペプチドのアミノ酸配列を少なくとも含むL鎖の402位～498位のペプチド中の部分アミノ酸配列からなるペプチド誘導体が挙げられる。さらに、実験結果から、HKaの接着コアの部位は、P1またはP5ペプチドのC末部分(410位～420位、492位～498位)のあたりにも存在する。

Patent: JP408208692

(5)

特開平8-208692

7

【0015】2) 2本鎖ヒト高分子キニノゲン(HKa) 接着コアの特性

HKaの接着コアは、前述のようにP1、P2およびP5ペプチドに対応する部分の三箇所にあることが明らかとなったが、この接着コアに該当するアミノ酸配列は今まで報告されている細胞接着活性蛋白質の接着コアを形成するアミノ酸配列のいずれとも類似していない。例えば、細胞接着活性蛋白質であるビトロネクチン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン、ラミニン、コラーゲン、フォン・ビルブランド(von Willebrand)因子、スロンボスポンディンの接着コアを形成するアミノ酸配列と、P1、P2またはP5ペプチドのアミノ酸配列とを比較しても、その間に類似性が見出せなかった。一方、HKaを用いた各種の細胞接着活性蛋白質に対する抑制活性試験の結果から、HKaがβ<sub>1</sub>インテグリンの働きを阻害するとされている(Asakura et al., 前掲)。従って、HKaの三箇所ある接着コアは細胞表面に存在するβ<sub>1</sub>インテグリンのリセプターに結合すると考えられる。図7に示されるように、P5ペプチドはP1ペプチドの細胞接着活性を阻害している。このことは、P5ペプチドとP1ペプチドが同じ細胞表面上のリセプターに結合することを示している。しかし、P2ペプチドはP1ペプチドの細胞接着活性を阻害しなかった。このことは、P2ペプチドがP1ペプチドとは異なるリセプターに結合することを示している。以上のことから、HKaの三箇所の接着コアの内、二箇所の接着コア(P1およびP5ペプチドの対応部分)は、アミノ酸配列に相違があるものの、細胞表面の同じリセプター(β<sub>1</sub>インテグリンのリセプター)と結合することが明らかとなった。また、もう一箇所の接着コア(P2ペプチドの対応部分)は、それとは異なることが明らかにされた。

【0016】メサングウム細胞を用いた細胞接着活性試験を、P2およびP5ペプチドを例として用いて行った。その結果、図8および図9に示される様に、P2およびP5ペプチドはメサングウム細胞を伸展させる作用を有することから、メサングウム細胞と接着することが示された。この結果から、P2およびP5ペプチド等の本発明のペプチド誘導体は、メサングウム細胞に接着することで、ビトロネクチンやフィブリノーゲンを介するメサングウム細胞の接着を抑制することができ、それによりメサングウム細胞の増殖を抑えることで糸球体腎炎を治療することができることがわかる。

【0017】本明細書において、アミノ酸、アミノ酸誘導体、ペプチド、その他に関して略号で表示する場合は、IUPAC-IUBの規定または当該分野における慣用記号に従うものとする。またアミノ酸等に関して光学異性体があり得る場合は、D-型、L-型のいずれの場合も含むが、特に明記せず略号、慣用記号を用いた場合は、L-型を示すものとする。

8

【0018】アミノ酸の具体例を略号とともに以下に示す。

略号(3文字、1文字)	名称(構造)
Asp, D	アスパラギン酸
Gly, G	グリシン
Ile, I	イソロイシン
Leu, L	ロイシン
Pro, P	プロリン
Arg, R	アルギニン
Ser, S	セリン
Tyr, Y	チロシン
Asn, N	アスパラギン
Thr, T	スレオニン
His, H	ヒスチジン
Phe, F	フェニルアラニン
Val, V	バリン
Lys, K	リジン
Gln, Q	グルタミン
Met, M	メチオニン
Trp, W	トリプトファン
Glu, E	グルタミン酸
Ala, A	アラニン
Cys, C	システイン

【0019】本発明のペプチド誘導体は、化学的合成法および遺伝子工学的手法を用いた合成法のいずれの方法にても合成することができる。化学的合成法においては、液相法、固相法が知られているが、いずれの方法にても合成可能である。また、目的とする1次配列をN末端またはC末端より順次構築するステップワイズ延長法、目的とする1次配列を適当なフラグメントに分け、それらフラグメントを縮合させて目的物を構築するフラグメント縮合法が知られているが、いずれの方法またはそれらを組み合わせることにより、合成することができる。また、必要に応じては、官能基(アミノ基、カルボキシル基、グアニジノ基、水酸基等)を保護してもよい。縮合法、活性化法、保護基及び反応条件等については、「ペプチド合成の基礎と実験」(丸善株式会社、1985年)、「生化学実験講座・第一巻 蛋白質の化学IV」(東京化学同人、1976年)などに記載の通常のペプチド合成に用いられる方法、保護基、反応条件を用いて合成することができる。以上のようにして合成された本発明のペプチド誘導体は、必要に応じてさらに逆相HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの通常のペプチドの精製法に従って、精製することができる。また、本発明の化合物は医薬品として用いるために、薬学的に許容する塩、例えば塩酸塩、硫酸塩等の無機酸との塩や、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩等の有機酸との塩にしてもよく、そのような塩への変換は、慣用手段で行うことができる。

【0020】本発明のペプチド誘導体は、細胞接着活性蛋白質が有する接着コアのアミノ酸配列部分であるRGD配列を持たない新規な細胞接着抑制活性のペプチド誘導体である。本発明のペプチド誘導体は、RGD配列を有する細胞接着活性ペプチドと同様の機序で細胞に接着すると考えられる。そのために細胞接着活性蛋白質のアゴニストまたはアンタゴニストとして、種々の生物活性例えば癌転移抑制作用などの生物活性および強力な血小板凝集抑制作用を有する。また、2本鎖ヒト高分子キニンゲン(HKa)は血小板の接着を抑制し、抗血栓作用を示すと共に、癌細胞や血管内皮細胞の細胞接着を抑制しているが、この機序もHKaの接着コアを介すると考えられる。従って、本発明のペプチド誘導体はHKaのアンタゴニストとして働くことから、癌転移抑制、血小板凝集抑制にとどまらず、血栓や炎症の抑制、動脈硬化抑制等の作用を有する。また、本願発明のペプチド誘導体は、糸球体腎炎のよい治療剤でもある。糸球体腎炎の中でも特に膜性増殖性糸球体腎炎の治療剤として好ましい。ここで、膜性増殖性糸球体腎炎とは、メサングウム細胞の増生、増殖と糸球体基底膜の肥厚を特徴とする腎炎である(「腎・泌尿器疾患」織田敏次、五島雄一郎編集 朝倉書店刊1983 99頁)。

【0021】従って本発明の新規な細胞接着活性ペプチド誘導体は、医薬品、動物薬として極めて有効である。本発明のペプチド誘導体は、通常それ自体公知の担体、希釈剤などを用い、適宜の医薬品組成物よりなる製剤(例えば、カプセル剤、注射剤など)として経口的または非経口的に投与される。癌転移抑制剤または、血小板凝集抑制剤として投与する場合には、本発明のペプチドは、 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲で、症状、年齢、体重等に基づいて決定され、1日1回から数回に分けて投与することができる。

#### 【0022】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなげら限定されるものではない。

#### 【0023】実施例1

Gly-Lys-Glu-Gln-Gly-His-Thr-Arg-Arg-His-Asp-Trp  
(配列番号:1)の製造

Gly-Lys-Glu-Gln-Gly-His-Thr-Arg-Arg-His-Asp-Trp (P1b)の製造は、不溶性の樹脂上でペプチド鎖をC末端からN末端方向にFmoc法により固相合成により実施した。使用した樹脂として、粒径100~200メッシュの4-(2'-4'-Dimethoxy Phenylfluorenylaminoethyl)-Phenoxy resin(渡辺化学)を用い、自動合成機(System 990, Beckman)により行った。合成したペプチド樹脂約1gにトリフルオロ酢酸中にフェノール5%、チオアニソール5%、水5%、エタンジテオール2.5%を含む試薬20mlを加えて室温にて2.5時間攪拌した。10分間氷冷し、ジエチルエーテル50mlを添加して室温にて30分間攪拌後、グラ

スフィルターにて濾過した。濾上物をジエチルエーテルにて洗浄し(10ml×20回)、20%酢酸溶液にて目的とするペプチドを抽出した(20ml×3回)。この抽出液を濃縮、凍結乾燥することにより粗ペプチドを得た。得られた粗ペプチドを5%酢酸溶液に溶解し、予め0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化した逆相系充填剤 YMC-ODS-120A-S15/30カラム(50×500mm)に注入し、0.1%トリフルオロ酢酸で洗浄した後、アセトニトリル濃度を180分間で15%まで増加させ、流速15ml/minで溶出した。溶出液を220nmにおける吸光度によりモニターし、目的物を含む画分を集めて凍結乾燥することで、Gly-Lys-Glu-Gln-Gly-His-Thr-Arg-Arg-His-Asp-Trp (P1b)を得た。

#### 【0024】アミノ酸分析

加水分解:6N塩酸、110°C、24時間

分析方法:PICO-TAG法

\*基準アミノ酸( )内理論値

Asx 0.59 (1)

Glx 2.06 (2)

\*Gly 2

His 2.01 (2)

Arg 1.76 (2)

Thr 1.01 (19)

Lys 0.80 (1)

HPLC保持時間:15.5分

(カラム:YMC-ODS 5 $\mu\text{m}$  4.6mm $\Phi$ ×250mm、検出波長:220nm、検出液:A液 0.1%TFA/水、B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN、流速:1.0ml/min、グラジエント:B液濃度を10%から毎分0.5%上昇させた。)

#### 【0025】実施例2

Gly-Lys-Glu-Gln-Gly-His-Thr-Arg-Arg-His-Asp-Trp-Gly-His-Glu-Lys-Gln-Arg-Lys (配列番号:2)の製造  
実施例1記載の方法と同様の方法によって、Gly-Lys-Glu-Gln-Gly-His-Thr-Arg-Arg-His-Asp-Trp-Gly-His-Glu-Lys-Gln-Arg-Lys (P1=P1c)を得た。

#### アミノ酸分析

加水分解:6N塩酸、110°C、24時間

分析方法:PICO-TAG法

\*基準アミノ酸( )内理論値

Asx 0.9 (1)

Glx 4.6 (2)

Gly 3.3 (3)

His 3.7 (3)

Arg 3.2 (3)

\*Thr 1

Lys 3.5 (3)

HPLC保持時間:22.3分

(カラム:YMC-ODS 5 $\mu\text{m}$  4.6mm $\Phi$ ×250mm、検出波長:220nm、検出液:A液 0.1%TFA/水、B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN、

流速: 1.0 ml/min, グラジエント: B液濃度を5%から毎分1%上昇させた。) )

【0026】実施例3

His-Asn-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys-His-Glu-Arg-Asp-Gln-Gly-His-Gly-His-Gln-Arg-Gly (配列番号: 3) の製造

実施例1記載の方法と同様の方法によって、His-Asn-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys-His-Glu-Arg-Asp-Gln-Gly-His-Gly-His-Gln-Arg-Gly (P2=P2b) を得た。

アミノ酸分析

加水分解: 6N塩酸、110°C、24時間

分析方法: PICO-TAG法

\*基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Asx 2.1 (2)

Glx 3.3 (3)

Gly 5.3 (5)

His 6.3 (6)

Arg 2.1 (2)

\*Leu 1

Lys 1.3 (1)

HPLC保持時間: 18.3分

(カラム: SUMIPAX ODS A-211 5μm 4.6mmφ×250mm, 検出波長: 220nm, 検出液: A液 0.1%TFA/水、B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN、流速: 1.0ml/min、グラジエント: B液濃度を20%から毎分1%上昇させた。)

【0027】実施例4

His-Lys-His-Gly-His-Gly-His-Gly-Lys-His-Lys-Asn-Lys (配列番号: 4) の製造

実施例1記載の方法と同様の方法によって、His-Lys-His-Gly-His-Gly-His-Gly-Lys-His-Lys-Asn-Lys (P5a) を得た。

アミノ酸分析

加水分解: 6N塩酸、110°C、24時間

分析方法: PICO-TAG法

\*基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Asx 1.07 (1)

Gly 3.22 (3)

His 5.44 (5)

\*Lys 4

HPLC保持時間: 13.6分

(カラム: YMC-ODS 5μm 4.6mmφ×250mm, 検出波長: 220nm, 検出液: A液 0.1%TFA/水、B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN、流速: 1.0ml/min、グラジエント: B液濃度を5%から毎分2%上昇させた。)

【0028】実施例5

His-Lys-His-Gly-His-Gly-His-Gly-Lys-His-Lys-Asn-Lys-Gly-Lys (配列番号: 5) の製造

実施例1記載の方法と同様の方法によって、His-Lys-His-Gly-His-Gly-His-Gly-Lys-His-Lys-Asn-Lys-Gly-Lys (P5b) を得た。

アミノ酸分析

加水分解: 6N塩酸、110°C、24時間

分析方法: PICO-TAG法

\*基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Asx 1.06 (1)

Gly 4.29 (4)

10 His 5.97 (5)

\*Lys 4

HPLC保持時間: 11.4分

(カラム: YMC-ODS 5μm 4.6mmφ×250mm, 検出波長: 220nm, 検出液: A液 0.1%TFA/水、B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN、流速: 1.0ml/min、グラジエント: B液濃度を5%から毎分1%上昇させた。)

【0029】実施例6

His-Lys-His-Gly-His-Gly-His-Gly-Lys-His-Lys-Asn-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Gly-Lys-His (配列番号: 6) の製造

実施例1記載の方法と同様の方法によって、His-Lys-His-Gly-His-Gly-His-Gly-Lys-His-Lys-Asn-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Gly-Lys-His (P5=P5c) を得た。

アミノ酸分析

加水分解: 6N塩酸、110°C、24時間

分析方法: PICO-TAG法

\*基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Asx 2.0 (2)

30 Gly 4.9 (5)

His 6.7 (6)

\*Lys 7

HPLC保持時間: 17.3分

(カラム: YMC-ODS 5μm 4.6mmφ×250mm, 検出波長: 220nm, 検出液: A液 0.1%TFA/水、B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN、流速: 1.0ml/min、グラジエント: B液濃度を5%から毎分1%上昇させた。)

【0030】参考例1

Gly-Lys-Glu-Gln-Gly-His-Thr-Arg (配列番号: 7) の製造

実施例1記載の方法と同様の方法によって、Gly-Lys-Glu-Gln-Gly-His-Thr-Arg (P1a) を得た。

アミノ酸分析

加水分解: 6N塩酸、110°C、24時間

分析方法: PICO-TAG法

\*基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Glx 2.0 (2)

\*Gly 2

50 His 1.2 (1)



Arg 0.9 (1)

Thr 1.0 (1)

Lys 1.0 (1)

HPLC保持時間: 16.3分

(カラム: SUMIPAX ODS A-211 5 $\mu$ m 4.6mm $\Phi$ ×250mm, 検出波長: 220nm, 検出液: A液 0.1%TFA/水, B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN, 流速: 1.0ml/min, グラジエント: B液濃度を0%から毎分1%上昇させた。)

## 【0031】参考例2

His-Asn-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys-His-Glu-Arg-Asp  
(配列番号: 8) の製造

実施例1記載の方法と同様の方法によって、His-Asn-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys-His-Glu-Arg-Asp (P2a) を得た。

## アミノ酸分析

加水分解: 6N塩酸, 110°C, 24時間

分析方法: PICO-TAG法

\*基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Asx 2.1 (2)

Glx 1.1 (1)

Gly 2.1 (2)

His 4.5 (4)

Arg 1.0 (2)

\*Leu 1

Lys 1.1 (1)

HPLC保持時間: 13.3分

(カラム: SUMIPAX ODS A-211 5 $\mu$ m 4.6mm $\Phi$ ×250mm, 検出波長: 220nm, 検出液: A液 0.1%TFA/水, B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN, 流速: 1.0ml/min, グラジエント: B液濃度を5%から毎分1%上昇させた。)

## 【0032】参考例3

Gly-Leu-Gly-His-Gly-His-Glu-Gln-Gln-His-Gly-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys (配列番号: 9) の製造

実施例1記載の方法と同様の方法によって、Gly-Leu-Gly-His-Gly-His-Glu-Gln-Gln-His-Gly-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys (P3) を得た。

## アミノ酸分析

加水分解: 6N塩酸, 110°C, 24時間

分析方法: PICO-TAG法

\*基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Glx 3.3 (3)

Gly 6.5 (6)

His 5.8 (5)

\*Leu 2

Lys 1.1 (1)

HPLC保持時間: 16.7分

(カラム: SUMIPAX ODS A-211 5 $\mu$ m 4.6mm $\Phi$ ×250mm, 検出波長: 220nm, 検出液: A液 0.1%TFA/水, B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN, 流速: 1.0ml/min, グラジエント: B液濃度を5%から毎分1%上昇させた。)

## 【0033】参考例4

Phe-Lys-Leu-Asp-Asp-Asp-Leu-Glu-His-Gln-Gly-Gly-His-Val-Leu-Asp-His-Gly-His-Lys (配列番号: 10) の製造

## 10 製造

実施例1記載の方法と同様の方法によって、Phe-Lys-Leu-Asp-Asp-Asp-Leu-Glu-His-Gln-Gly-Gly-His-Val-Leu-Asp-His-Gly-His-Lys (P4) を得た。

## アミノ酸分析

加水分解: 6N塩酸, 110°C, 24時間

分析方法: PICO-TAG法

\*基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Asx 4.3 (4)

Glx 2.2 (2)

20 Gly 3.3 (3)

His 4.5 (4)

Val 0.9 (1)

\*Leu 3

Phe 1.0 (1)

Lys 2.2 (2)

HPLC保持時間: 16.0分

(カラム: SUMIPAX ODS A-211 5 $\mu$ m 4.6mm $\Phi$ ×250mm, 検出波長: 220nm, 検出液: A液 0.1%TFA/水, B液 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN, 流速: 1.0ml/min, グラジエント: B液濃度を15%から毎分1%上昇させた。)

## 【0034】試験例1

P1, P2, P3およびP5ペプチドの線維芽細胞の接着および伸展作用

## ①細胞液

マウス 3T3線維芽細胞は岩城硝子より提供されたものを用いた。これらの細胞は10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改良イーグル基礎培地にて培養した。ほぼコンフルエントとなった細胞を0.25%トリプシン/5mM EDTA液により培養皿より剥がし、0.2%牛血清アルブミン (BSA) を含むダルベッコ改良イーグル基礎培地にて2×10<sup>4</sup> cells/ml となるように調製した。

## 【0035】②細胞接着・伸展活性の測定方法

96穴ポリスチレンプレート (タイターテック社) に種々濃度の (P1, P2, P3およびP5) ペプチド溶液 (100 $\mu$ l/well) を添加して4℃にて一晩放置することによりコーティングし、さらに1%牛血清アルブミン (BSA) を250 $\mu$ l/well添加して37℃にて1時間放置することによりブロッキングした。プレートを0.2% BSAを含むTBS (T

ris-buffered saline, 0.1M NaClを含む50mM Tris-HCl, pH7.4)にて数回洗浄した後、 $2 \times 10^4$  cells/ml となるように①で調製したマウス 3T3線維芽細胞の細胞液を100ml/well添加して37℃にて2時間放置した。TBSにてプレートに洗浄することにより非接着細胞を除去した後、プレートに接着したマウス 3T3線維芽細胞の細胞数及びその伸展した細胞数を計測した。ここで伸展した細胞とは顕微鏡下において多角形(polygonal)であり、球形を呈する非接着細胞に比べ、その表面積が2倍以上大きいものをいう。その結果を図1に示す。この結果によれば、P1、P2またはP5ペプチドの場合、ペプチド濃度に依存して接着細胞数が増加し、 $10 \mu\text{M}$ の濃度で最大の接着細胞数を示した。また、P1、P2およびP5以外のペプチドは細胞接着活性を示さなかった。

#### 【0036】試験例2

##### P1、P2およびP5ペプチドの線維芽細胞の接着抑制作用

試験例1記載の方法と同様に行った。まず、96穴のマイクロタイタープレートをP1、P2またはP5ペプチドでコートする。TBSで洗浄した後、各種の濃度のP1、P2またはP5ペプチドと共に、線維芽細胞を加えて、37℃で120分間培養した。TBSにてプレートを洗浄し、非接着細胞を除去した後、顕微鏡下でプレートに接着し、伸展した細胞数を計測した。その結果を図2に示す。この結果によれば、プレートに接着し、伸展する細胞数は、同じペプチドを添加することによって阻害される。このことは、これらP1及びP5ペプチドが細胞表面のリセプターに付着するため、細胞がプレートに接着することができなくなったことを示している。

#### 【0037】試験例3

##### P1、P2およびP5ペプチドによる線維芽細胞の細胞接着作用に対する2本鎖高分子キニノゲン(HKa)の抑制作用

HKaは、J. Cell. Biol., 116, 465(1992)記載の方法によって精製した。マイクロタイタープレートを $10 \mu\text{g/ml}$ のP1、P2またはP5ペプチドでコーティングし、線維芽細胞を種々のHKa存在下で37℃にて2時間培養した。この時の伸展した細胞数を計測した。その結果を図3に示す。この結果によれば、HKaが濃度依存でP1、P2またはP5ペプチドの細胞接着作用を阻害することを示している。このことは、P1、P2およびP5ペプチドがHKaの接着コアに対応する部分であることを明らかにしている。

#### 【0038】試験例4

##### P1a、P1bおよびP1cペプチドの線維芽細胞の伸展作用

試験例1記載の方法と同様の方法によって、P1a、P1bおよびP1cペプチドの細胞接着作用を測定した。まず、96穴のプレートに各種の濃度の3種のペプチドを加えて、37℃で2時間保持してコートし、1% BSA-TBS

で洗浄した後、3T3線維芽細胞のDMEM-0.2%BSA溶液を加えた。37℃で2時間培養後、顕微鏡下でプレートに接着し、伸展した細胞数を計測した。その結果を図4に示す。この結果によれば、P1ペプチドのC末部分が欠落するにつれて作用が弱くなり、C末が11個欠落したP1aには全く作用がないことが示された。

#### 【0039】試験例5

##### P2aおよびP2bペプチドの線維芽細胞の伸展作用

試験例4記載の方法によって、P2aおよびP2bペプチドの細胞接着作用を測定した。その結果を図5に示す。この結果によれば、P2ペプチドのC末部分が欠落すると作用がなくなり、C末が9個欠落したP2aでは全く作用を示さないことが明らかとなった。

#### 【0040】試験例6

##### P5a、P5bおよびP5cペプチドの線維芽細胞の伸展作用

試験例4記載の方法によって、P5a、P5bおよびP5cペプチドの細胞接着作用を測定した。その結果を図6に示す。この結果によれば、P5ペプチドのC末部分が欠落するにつれて作用が弱くなり、C末が7個欠落したP5aになるとP5cの約25%の作用しか示さないことが明らかとなった。

#### 【0041】試験例7

##### P1ペプチドによる線維芽細胞の細胞接着作用に対するP2およびP5ペプチドの抑制作用

###### ①細胞液

線維芽細胞を用いて、試験例1の①記載の方法により細胞液を調製した。

###### ②細胞伸展阻害活性の測定方法

マイクロタイタープレートに $10 \mu\text{M}$ のP1ペプチドを添加し、4℃にて一晩放置することによりコーティングした。種々の濃度のP2またはP5ペプチドと共に3T3線維芽細胞をプレートに加えて培養し、その後の接着、伸展した細胞数を計測した。その結果を図7に示す。この結果によれば、P5ペプチドはP1ペプチドを介した細胞接着を阻害することが示されている。このことは、P1およびP5ペプチドが細胞表面の同じリセプターに結合することを示している。一方、P2ペプチドはP1ペプチドを介した細胞接着を阻害せず、P2が結合する細胞表面のリセプターはP1およびP5ペプチドのリセプターとは異なることを示している。

#### 【0042】試験例8

##### P2およびP5ペプチドのメサングウム細胞の伸展作用

###### ①細胞液

ラットメサングウム細胞は、Virchows Arch Cell Pathol., 49, 285 (1985)の方法により取得した。この細胞は10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改良イーグル基礎培地にて培養した。

###### ②細胞接着・伸展活性の測定方法

2 cm<sup>2</sup> ウェルのポリスチレンプレート (24穴Costarプレ

生物名: ヒト

## 配列

His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys  
 1 5 10 15

【0049】配列番号: 6

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

\* 配列の種類: ペプチド

起源

生物名: ヒト

\*

## 配列

His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Asn Gly Lys His  
 20

【0050】配列番号: 7

配列の長さ: 8

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源

生物名: ヒト

## 配列

Gly Lys Glu Gln Gly His Thr Arg  
 1 5

【0051】配列番号: 8

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

※

## 配列

Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His Gly Leu Gly His Gly  
 1 5 10 15  
 His Lys

【0053】配列番号: 10

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

## 配列

Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His Gln Gly Gly His Val Leu  
 1 5 10 15  
 Asp His Gly His Lys  
 20

★トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源

★ 生物名: ヒト

## 【図面の簡単な説明】

【図1】P1、P2、P3およびP5ペプチドの線維芽細胞の接着および伸展作用

種々の濃度のP1、P2、P3またはP5ペプチドでコーティングしたプレートに接着した線維芽細胞の細胞数(A)及びその伸展した細胞数(B)を示す。接着した細胞数(A)についてはP1(1μM)ペプチドでコーティングした時に得られる接着細胞数を100%として表した。

【図2】P1、P2およびP5ペプチドの線維芽細胞の

## 接着抑制作用

P1、P2またはP5ペプチドでコートされたプレートに、線維芽細胞と共に種々の濃度のP1、P2またはP5ペプチドを添加、共存させて培養した後、このプレートに接着し、伸展する細胞数を測定した結果を表す。

【図3】HKAの添加による線維芽細胞の接着抑制作用

P1、P2またはP5ペプチドでコートされたプレートに、線維芽細胞と共に種々の濃度のHKAを添加、共存させて培養した後、このプレートに接着し、伸展する細胞

胞数を表す。

【図4】P1a、P1b およびP1c ペプチドの線維芽細胞の伸展作用

種々の濃度のP1a、P1b およびP1c ペプチドでコーティングしたプレートを用いて、これに接着し、伸展する細胞数を示す。

【図5】P2a およびP2b ペプチドの線維芽細胞の伸展作用

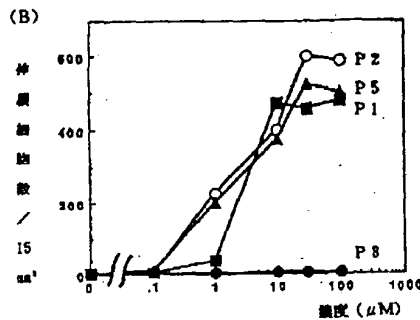
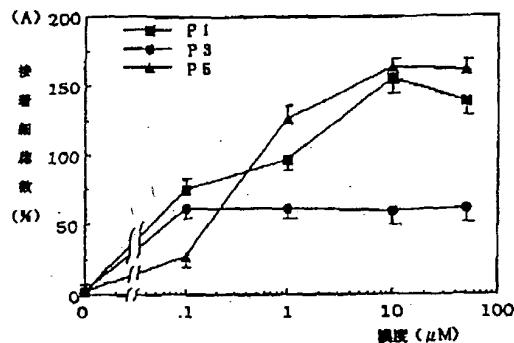
種々の濃度のP2a およびP2b ペプチドでコーティングしたプレートを用いて、これに接着し、伸展する細胞数を示す。

【図6】P5a、P5b およびP5c ペプチドの線維芽細胞の伸展作用

種々の濃度のP5a、P5b およびP5c ペプチドでコーティングしたプレートを用いて、これに接着し、伸展する細胞数を示す。

【図7】P2およびP5ペプチドの線維芽細胞の接着抑制作用

【図1】



P1ペプチドでコートされたプレートに、線維芽細胞と共に種々の濃度のP2ペプチド (○) あるいはP5ペプチド (▲) を添加し、共存させて培養した後、このプレートに接着し、伸展する細胞数を示す。

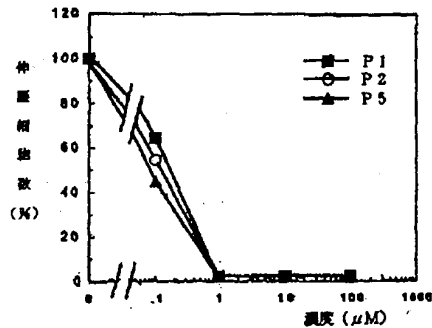
【図8】P2およびP5ペプチドのメサンギウム細胞の伸展作用

種々の濃度のP2またはP5ペプチドでコーティングしたプレートに接着し、伸展するメサンギウム細胞の細胞数を示す。

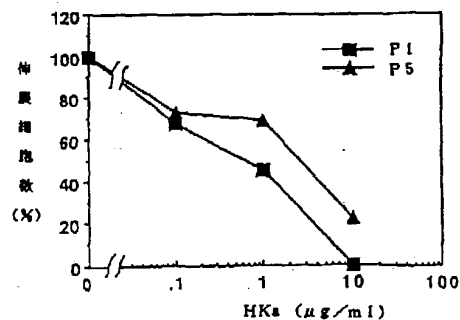
【図9】P2またはP5ペプチドでコートされたプレートへのメサンギウム細胞の接着に対するRGDペプチドによる抑制作用

P2またはP5ペプチドでコーティングしたプレートに、メサンギウム細胞と共に種々の濃度のGRGDSP (RGDペプチド) を添加、共存させて培養した後、このプレートに接着し、伸展する細胞数を測定した結果を表す。

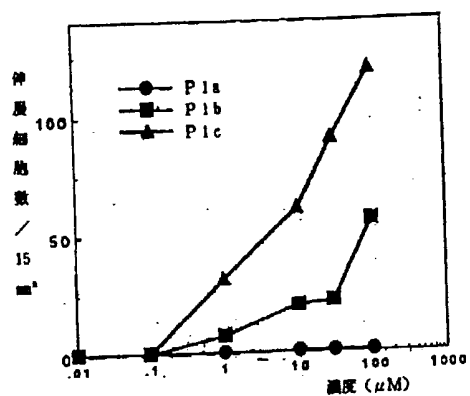
【図2】



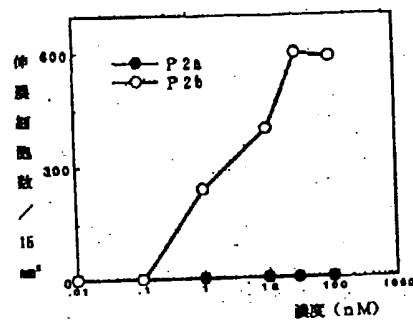
【図3】



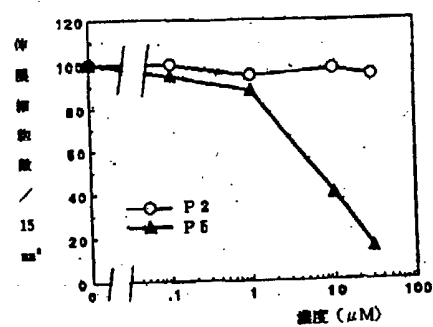
【図4】



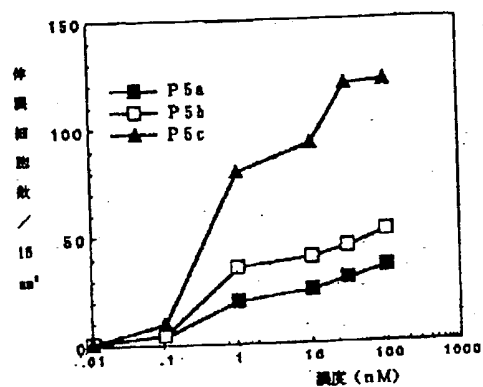
【図5】



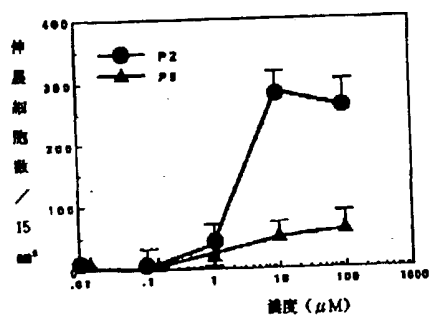
【図7】



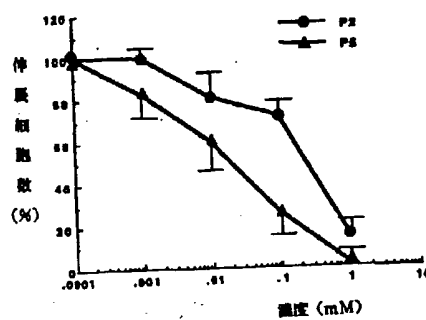
【図6】



【図8】



【図9】



(14)

特開平8-208692

フロントページの続き

(51)Int. Cl. 6

A 6 1 K 38/00  
38/17

C 0 7 K 7/06

識別記号

ADU  
ACB  
ADS

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 37/02  
37/42

ADU  
ACB  
ADS